

荧光金纳米团簇探针的生物成像应用进展 (特邀)

钟文成, 郭文锋, 尚 利*

(西北工业大学 材料学院 凝固技术国家重点实验室, 陕西 西安 710072)

摘要: 金纳米团簇 (AuNCs) 因兼具优异荧光特性、超小尺寸、精确化学组成及良好生物相容性等优势, 使其成为近些年备受关注的新型荧光探针。为了推动荧光 AuNCs 在成像领域的应用, 研究者们一直致力于发展高性能荧光 AuNCs 的设计与制备策略。基于对 AuNCs 结构与发光机制的理解, 诸如提高荧光量子产率和细胞摄取率等策略陆续被提出以增强 AuNCs 的细胞成像效果, 极大提升了其作为荧光成像探针的潜力, 并将 AuNCs 的应用推广至荧光寿命成像、多光子成像等新兴荧光成像技术。近些年发展的具有近红外二区荧光的 AuNCs 进一步推动了其在活体成像的应用。文中概述了 AuNCs 的制备方法、提高 AuNCs 细胞荧光成像效果的各种策略, 以及 AuNCs 荧光成像应用的最新进展, 并对该领域的挑战和未来发展进行了展望。

关键词: 金纳米团簇; 荧光成像; 细胞靶向; 荧光探针

中图分类号: O6-1 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA20220527

Advances in biological imaging applications of fluorescent gold nanoclusters (*invited*)

Zhong Wencheng, Guo Wenfeng, Shang Li*

(State Key Laboratory of Solidification Processing, School of Materials Science and Engineering,
Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract: In recent years, due to the unique advantages such as excellent fluorescence properties, ultra-small size, precise chemical structure and good biocompatibility, gold nanoclusters (AuNCs) have become a kind of emerging fluorescent nanoprobe of great concern. In order to promote the application of AuNCs in fluorescence imaging, researchers have been devoted to designing preparation strategies for various high-performance fluorescent AuNCs. Based on the continuous understanding of the structure and luminescence mechanism of AuNCs, strategies such as enhancing the fluorescence quantum yield and cellular uptake of AuNCs have been proposed and applied to enhance the cellular imaging ability of AuNCs. These strategies greatly improve their potential as fluorescent imaging probes. Furthermore, fluorescent AuNCs are also utilized in advanced fluorescence imaging technologies such as fluorescence lifetime imaging and multi-photon fluorescence imaging. In addition, AuNCs with near-infrared II fluorescence have greatly promoted their application for in vivo imaging recently. This article summarizes the preparation methods of fluorescent AuNCs probes, reviews strategies to improve the fluorescence cellular imaging ability of AuNCs, and introduces the latest progress in the application

收稿日期: 2022-07-29; 修订日期: 2022-09-30

基金项目: 国家自然科学基金 (22274131); 西北工业大学博士论文创新基金 (CX2021053)

作者简介: 钟文成, 男, 博士生, 主要从事金纳米团簇基荧光探针的开发及其成像应用方面的研究。

导师(通讯作者)简介: 尚利, 男, 教授, 博士, 主要从事荧光纳米材料及其生物应用方面的研究。

of AuNCs in fluorescence imaging and also the challenges and future developments in the field.

Key words: gold nanoclusters; fluorescence imaging; cell-targeting; fluorescent probes

0 引言

AuNCs 一般由数个到数百个金原子构成,具有超小的尺寸,是一类近些年受到广泛关注的新型纳米材料^[1-5]。因其超小尺寸、优异的荧光性质、良好的生物相容性与光稳定性等特点,AuNCs 在传感^[6]、成像^[7]、疾病诊疗^[8]与催化^[9]等领域中均展现了极大的应用前景。目前常用的荧光 AuNCs 的制备方法为“自下而上”法,即在配体保护下将三价的 Au 离子还原形成 AuNCs,且以其中的配体辅助还原法最为常见^[10-12]。

配体辅助法就是指在配体存在的条件下,使用还原剂将金离子还原形成配体包覆的 AuNCs 的过程^[13-14]。

如图 1 所示,该方法中最重要的配体可以有多种选择,包括聚合物^[15]、DNA^[16]、硫醇分子^[17]以及蛋白质^[18]等。配体辅助法具有以下优点:一方面,选取水溶性良好的配体用于合成 AuNCs 可以显著改善 AuNCs 的水溶性、稳定性;另一方面,可以通过对金核表面的配体进行修饰以改变 AuNCs 的理化性质。近年来,AuNCs 在细胞、组织、活体层面荧光成像的应用获得了极大的进步。然而,面对更为复杂的荧光成像需求与新兴荧光成像技术,如何进一步地提高荧光成像效果,进而拓展 AuNCs 在新兴荧光成像技术领域的应用仍是一个值得关注的课题。

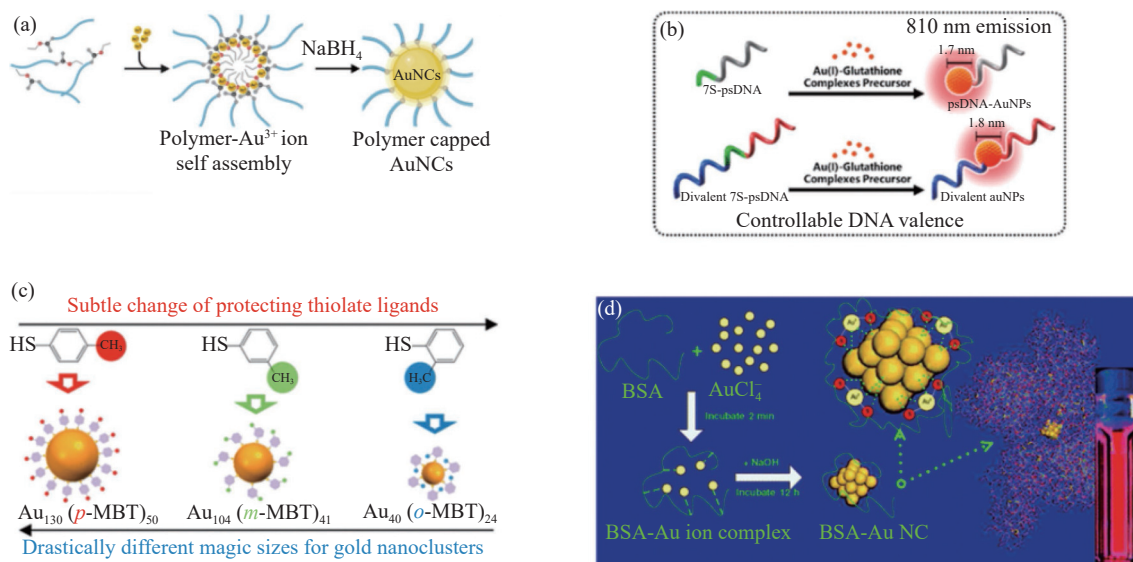


图 1 以 (a) 聚合物^[15]、(b) DNA^[16]、(c) 硫醇小分子^[17]、(d) 蛋白质^[18] 为模板合成的 AuNCs

Fig.1 Synthesis of AuNCs by using (a) polymers^[15], (b) DNA^[16], (c) thiol molecules^[17] and (d) proteins^[18] as templates

1 提高荧光 AuNCs 细胞成像效果的方法

在细胞成像应用中,理想的荧光探针应具备高量子产率、高信噪比、高特异性等特点^[19-20]。为了满足这些要求以实现较好的成像效果,如何精确设计和制备高性能荧光 AuNCs 探针至为关键。虽然在文献中已有大量报道将 AuNCs 作为新兴成像探针应用于荧光成像,然而其进一步的应用拓展仍受到荧光波长短、荧光量子产率低及亚细胞器靶向性差等因素的限制。为了解决这些问题,研究者们提出了多种有效的

AuNCs 功能化设计与制备策略,并取得了较为显著的进展。

1.1 增强 AuNCs 荧光量子产率的策略

当 AuNCs 的荧光量子产率显著高于细胞自荧光物质时,AuNCs 成像的信噪比将得到明显的提高,进而增强其细胞内荧光成像性能。为了有效地提高 AuNCs 的荧光量子产率,需要对该类材料的发光机理及其构效关系有一个清晰的认识。基于 AuNCs 精确的分子结构,研究者通过系统调控 AuNCs 的原子组成和配体性质等,深入研究了多种因素对于 AuNCs

荧光的影响,初步阐明了 AuNCs 的发光机理^[21-22]。目前,关于 AuNCs 的发光机理的解释中被广泛认可的观点是, AuNCs 的荧光来源于小尺寸 Au 核引起的离散电子能级,以及 Au 核-表面配体的电子传导等的综合效应。通过调控 Au 核的电子能级、增强 Au 核与配体之间的电子传导或者限制表面配体的自由度,以及利用 AuNCs 的聚集诱导发光性质等途径可以有效地提高 AuNCs 的荧光量子产率。因此,根据目前对 AuNCs 光致发光机理的理解,研究者们提出了多种可有效提高 AuNCs 荧光量子产率的设计与制备策略,如图 2 所示。

当前,普遍采用的提升 AuNCs 的荧光量子产率的方式主要可以分为合金掺杂、表面配体调控、自组装以及聚集诱导发光等。在合金掺杂策略中最常用的合金元素为银,这主要是由于 Au 与 Ag 性质相近(同属 IB 族元素)且晶格适配。2014 年,汪恕欣等人使用 Ag 掺杂策略将 AuNCs 的荧光量子产率提高到原先的 200 倍(图 2 (a))^[23]。除了 Ag 掺杂之外,姚传好等人采用 Cd 掺杂策略改变了金核的表面原子结构,从而显著提升了 AuNCs 的荧光量子产率^[24]。由于 AuNCs 的性质与金核及表面配体密切相关,除了对 AuNCs 的金核进行调控外, AuNCs 荧光量子产率的提升也可以通过配体改性实现。Chen Zhan 课题组以谷胱甘肽(GSH)和组氨酸为共配体,得到了比单独

组氨酸为配体所合成 AuNCs 荧光量子产率更高的产物^[25]。除此之外,通过限制 AuNCs 表面配体的自由度也可以显著提升 AuNCs 的荧光量子产率。例如,陈伟课题组以 6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶(ATT)作为配体合成 AuNCs,通过加入精氨酸与配体之间形成氢键,实现对配体灵活度的限制和簇内电子传导的增强,从而制备得到了超高荧光量子产率(65%)的绿色荧光 AuNCs(图 2(b))^[26],并在后续工作中基于相同原理以双席夫碱类分子增强 AuNCs 荧光,得到了量子产率为 48% 的红色荧光 AuNCs^[27]。

谢建平课题组于 2012 年报道了 AuNCs 的溶剂致聚集诱导发光现象,成功制备了荧光量子产率为 15% 的 AuNCs 聚集体(图 2 (c))^[28]。然而,在细胞成像的过程中,溶剂致聚集诱导发光现象在细胞环境、溶剂稀释等因素的影响下易失效,因此需要稳定的 AuNCs 聚集体制备方法。目前广泛采用的制备聚集体的方法为自组装策略,即将 AuNCs 组装为纳米片、纳米凝胶以及合成纳米颗粒等不同形貌。在各种组装策略中,基于各组分的正负电荷之间的静电作用所构建的 AuNCs 自组装体是较常采用的方法。例如,2016 年, Xavier Le Guével 课题组和谢建平课题组分别报道了以正电聚合物聚烯丙基胺盐酸盐(PAH)与壳聚糖诱导 AuNCs 自组装,结果表明得到的自组装纳米颗粒均具有更高的荧光量子产率(图 2 (d))^[29-30]。除此之

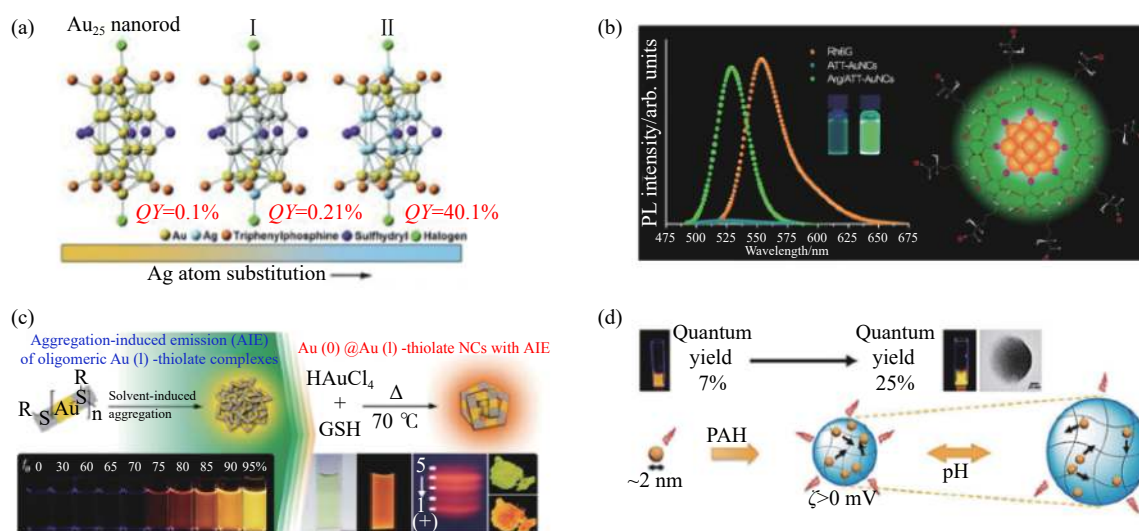


图 2 提升 AuNCs 量子产率的方式: (a) 合金掺杂改性 Au 核^[23]; (b) 表面配体工程^[26]; (c)、(d) 聚集诱导发光与 AuNCs 自组装^[28-29]

Fig.2 Methods to improve the quantum yield of AuNCs: (a) Alloy doping in Au core^[23]; (b) Surface ligand engineering^[26]; (c), (d) Aggregation-induced emission and AuNCs-based self-assemblies^[28-29]

外,基于主客体相互作用的超分子自组装也可以用于提高 AuNCs 的荧光量子产率^[31-32]。

1.2 提高 AuNCs 的细胞摄取率

增强 AuNCs 荧光成像过程中的信噪比的另一种方法是提高细胞对 AuNCs 的摄取效率。为了实现高的细胞摄取效率,阐明 AuNCs 的细胞内化机制具有较为重要的意义。2014 年, Nienhaus 课题组通过荧光成像详细研究了 HeLa 细胞对 AuNCs 的内化过程(图 3(a))^[33],发现在该过程中具有超小尺寸的 AuNCs 会先富集在细胞膜表面,进而主要通过网格蛋白介导的内吞机制和大胞饮作用进入细胞。作者还进一步

通过荧光寿命成像技术原位监控了 AuNCs 的胞内稳定性^[34],为设计开发高稳定、高成像性能的 AuNCs 提供了重要的基础。

除此之外,提高 AuNCs 的细胞摄取率还可以通过自组装^[35]、细胞靶向配体修饰^[36]以及表面正电荷修饰等方法^[37]。由于细胞膜的表面呈负电位,因此,相比表面带负电的 AuNCs,表面正电荷修饰的 AuNCs 更易于与细胞膜结合,从而提高 AuNCs 的细胞摄取率。然而,自组装与表面正电荷修饰虽然可以提高大部分细胞对于 AuNCs 的摄取率,但是无法区分不同的细胞类别,对于基于荧光成像的精准诊疗应用缺乏

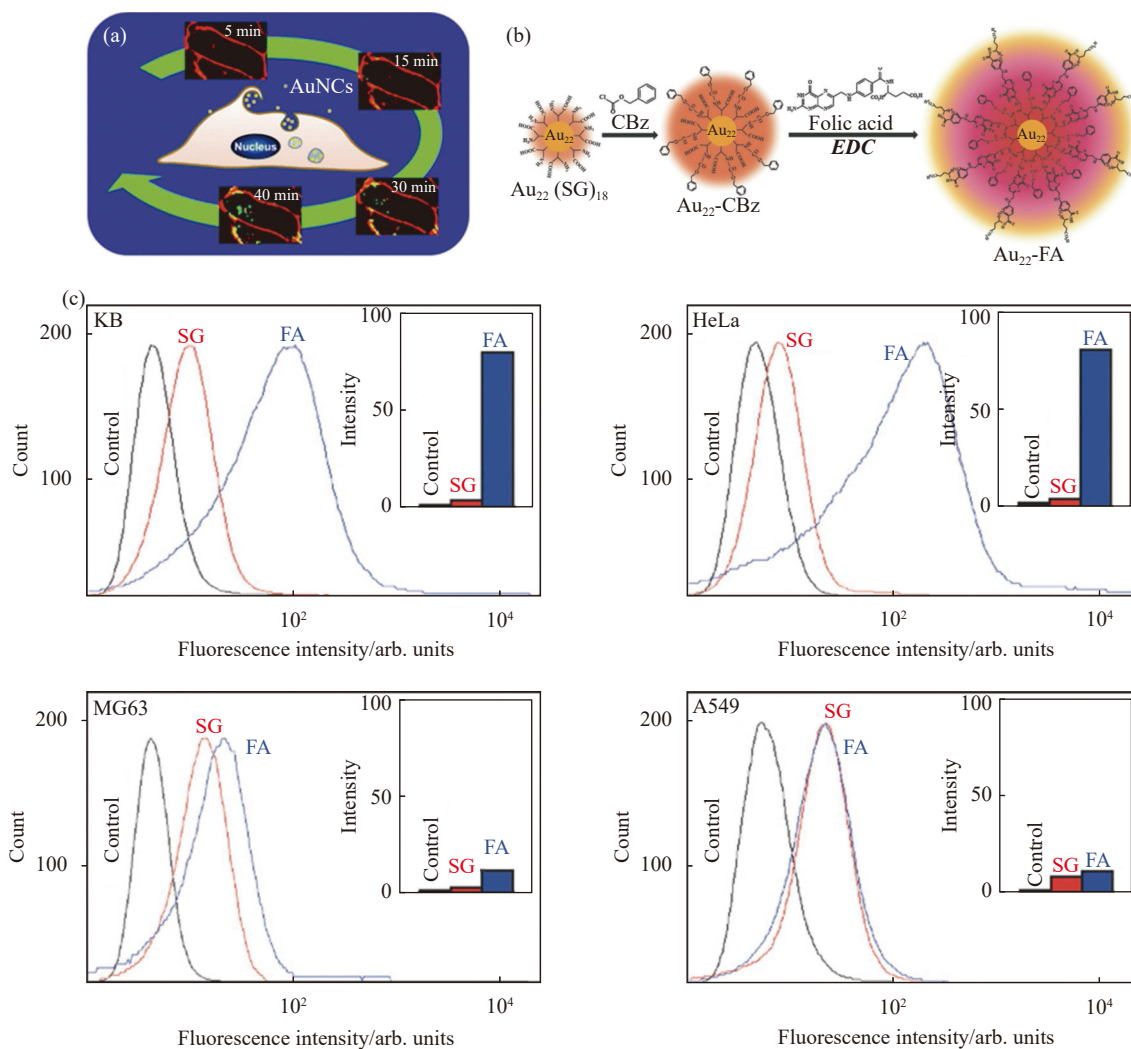


图 3 (a) 荧光成像技术研究 AuNCs 进入细胞的过程^[33]; (b) 在 AuNCs 表面修饰叶酸的示意图^[38]; (c) 通过流式细胞术研究未修饰 AuNCs (SG) 与叶酸修饰 AuNCs (FA) 在具有不同叶酸受体表达水平的细胞的摄取量差异^[38]

Fig.3 (a) Investigating the endocytosis of AuNCs by fluorescence imaging^[33]; (b) Scheme of modification of folic acid on the surface of AuNCs^[38]; (c) Differences in cellular uptake of unmodified AuNCs (SG) and folic acid-modified AuNCs (FA) in cells with different receptor expression levels by flow cytometry^[38]

指导意义。由于部分癌细胞表面具有比正常细胞更高的叶酸、糖受体的表达水平,因此通过修饰叶酸、糖类等特定生物分子不仅可以提高 AuNCs 在叶酸、糖类等受体过表达的癌细胞的摄取率,增强其荧光成像性能,也可以实现对此类癌细胞的特异性区分(图 3(b))^[38-39]。如图 3(c) 所示,叶酸修饰的 AuNCs 在叶酸受体过表达的 HeLa、KB 细胞的摄取量明显高于未过表达的 MG63、A549 等细胞。

1.3 靶向细胞器成像

随着 AuNCs 在细胞荧光成像方面的应用的逐步扩展,如何在亚细胞水平上控制 AuNCs 在细胞内的定位,进而实现精准的细胞器成像成为了研究者们普遍关注的问题。

借鉴其他荧光探针的靶向细胞器策略,多种特异性靶向细胞器的分子(如三苯基膦等)被用于修饰 AuNCs 表面以获得靶向细胞器的能力。例如,庞代文课题组通过特异性靶向细胞核的 TAT 多肽修饰 AuNCs,从而赋予 AuNCs 靶向细胞核的能力^[40]。朱满洲课题组在合成中加入带巯基的三苯基膦配体,将原先靶向溶酶体的 AuNCs 改造为可特异性靶向线粒体的 AuNCs^[41]。Yangang Wang 课题组将靶向内质网的磺酰脲化合物修饰于 AuNCs 表面后,表现出较为明显的靶向内质网的能力^[42]。这些具备特异性靶向性能的 AuNCs 为研究人员提供了进一步胞内精准成像的重要前提,借助于 AuNCs 的低毒性、优异的光稳定性等特点,使得长时间动态追踪特定细胞器的生物行为成为了可能。2021 年, Yuan Wang 等报道了一种可靶向线粒体的荧光 AuNCs,且其荧光寿命与温度密切相关,从而利用荧光寿命技术揭示了细胞内不同区域线粒体的温度存在明显差异(图 4)^[43]。

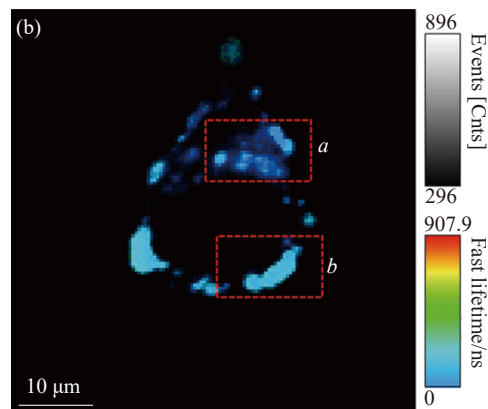


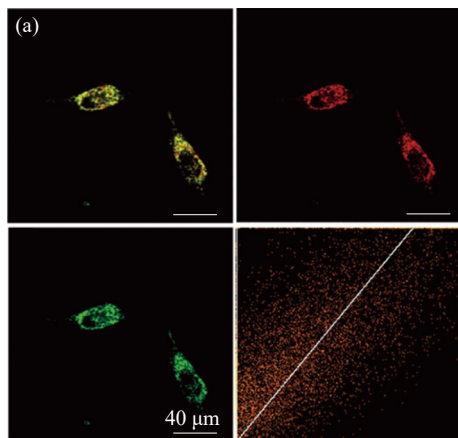
图 4 AuNCs 作为荧光探针实现细胞内 (a) 线粒体成像以及 (b) 使用荧光寿命成像技术研究细胞内不同区域线粒体温度分布^[43]

Fig.4 AuNCs as fluorescence probes for (a) cellular imaging of mitochondria and (b) investigating temperature of mitochondria in different regions within a cell through fluorescence lifetime imaging^[43]

2 AuNCs 在细胞成像中的其他应用

与传统的共聚焦荧光成像方式相比,荧光寿命成像、双光子荧光成像、超分辨成像等新的成像技术可以提供更高的信噪比和成像分辨率。目前,荧光 AuNCs 在双光子成像技术与荧光寿命成像的应用报道相对较多。相比生物体系的自荧光, AuNCs 普遍具有较长的荧光寿命,因而可以很容易通过荧光寿命成像来有效区分探针的荧光和自荧光,从而实现荧光成像性能的提升。例如,尚利等人合成了近红外荧光 AuNCs,在荧光寿命成像的过程中有效区分了强度信号无法区分的组分,并实现了基于荧光寿命的细胞内温度的实时监测(图 5(a))^[44-45]。双光子成像技术相比单光子成像技术而言具有更低的光子能量,且不易激发细胞内的自荧光组分。因此,具有优异双光子吸收性能的 AuNCs 在双光子甚至多光子成像技术下展现出了更为出色的细胞荧光成像能力(图 5(b))^[46-47]。

相比而言,目前关于 AuNCs 在超分辨成像技术领域的应用报道较少。其中, Hongwei Yang 等与 Aditya Yadav 等分别报道了 ATT/Arg-AuNCs(图 5(c))与 BSA-AuNCs(图 5(d))在受激辐射损耗(STED)成像技术与超分辨径向涨落成像方面的应用,分辨率分别达到 70 nm 与 59 nm,显著提升了 AuNCs 在细胞内荧光成像的分辨率^[48-49]。由于超分辨成像技术在生物



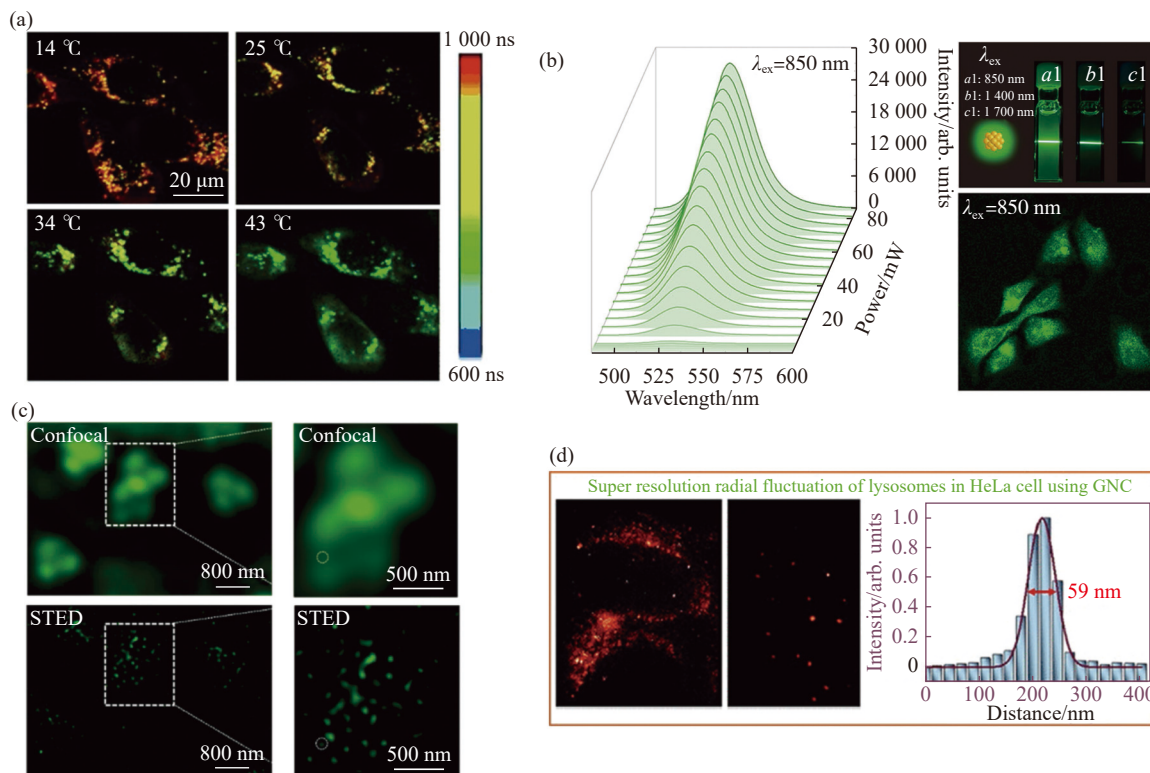


图 5 (a) AuNCs 作为成像探针应用于荧光寿命成像技术^[44]; (b) 利用 AuNCs 的多光子吸收性质实现细胞多光子成像^[47]; (c) 高稳定性、高量子产率的 AuNCs 用于 STED 成像^[48]; (d) BSA-AuNCs 用于超分辨径向涨落成像^[49]

Fig.5 Fluorescent AuNCs for (a) fluorescence lifetime imaging^[44], (b) multi-photon fluorescence imaging^[47], (c) STED imaging^[48] and (d) super-resolution radial fluctuations imaging^[49]

成像领域的巨大应用前景,发展能更好满足超分辨荧光探针需求的 AuNCs 将会是一个十分值得研究的方向。

3 AuNCs 在活体荧光成像的应用

早期研究中制备的 AuNCs 的荧光大多在可见光波段,且荧光量子产率较低,在进行活体荧光成像时,来自细胞、组织自荧光的干扰将会显著地影响 AuNCs 成像的效果,在一定程度上限制了 AuNCs 在活体水平的成像应用。为了避开几乎覆盖整个可见光波段的生物自荧光(400~700 nm),开发具有近红外一区荧光(650~900 nm)的 AuNCs 成为了较为广泛采用的一个解决方案。目前,研究人员已经设计合成了多种具有近红外一区荧光的 AuNCs,并将其成功用于生物荧光成像^[50]。然而,具有近红外一区荧光的 AuNCs 在活体水平成像层面仍存在组织穿透性差、信噪比较低等问题。这是由于与细胞成像应用相比,活体水平的荧光成像更具挑战。相较细胞而言,生物组织具有更强的自荧光,而且可见光的组织穿透深度

有限。近年来,研究人员发现部分 AuNCs 的荧光波段可以延伸至近红外二区(NIR-II,发射波长为 1 000~1 700 nm),显著推动了荧光 AuNCs 在活体成像领域方面的应用潜能^[51-58]。目前,已成功用于合成具有 NIR-II 荧光性质的 AuNCs 的配体包括硫醇小分子、多肽、蛋白质以及超分子等。如图 6 所示,具有 NIR-II 荧光发射的 AuNCs 已被成功应用于活体内各种器官的成像,其中包括胃肠道^[53]、骨^[54]、肾^[55]、血管^[56]等。

在借助 NIR-II 成像技术实现了更高穿透深度、更低背景噪音的前提下,研究人员进一步在 AuNCs 的成像应用方面实现了新的突破。例如, Xavier Le Guével 等通过调控 AuNCs 的 NIR-II 发光性质,实现了活体水平的三维 NIR-II 荧光成像^[51]。喻志强等将 NIR-II 荧光的 AuNCs 与顺铂药物结合,成功用于同步的荧光成像和肿瘤治疗^[52]。宋晓荣等将发射波长为 1 050 nm 的 AuNCs 组装于 Ln 纳米颗粒(发射波长为 1 550 nm)表面,实现了活体内比率荧光传感硫化氢(图 7(a))^[57]。杜国庆等通过将 Gd 修饰到 AuNCs

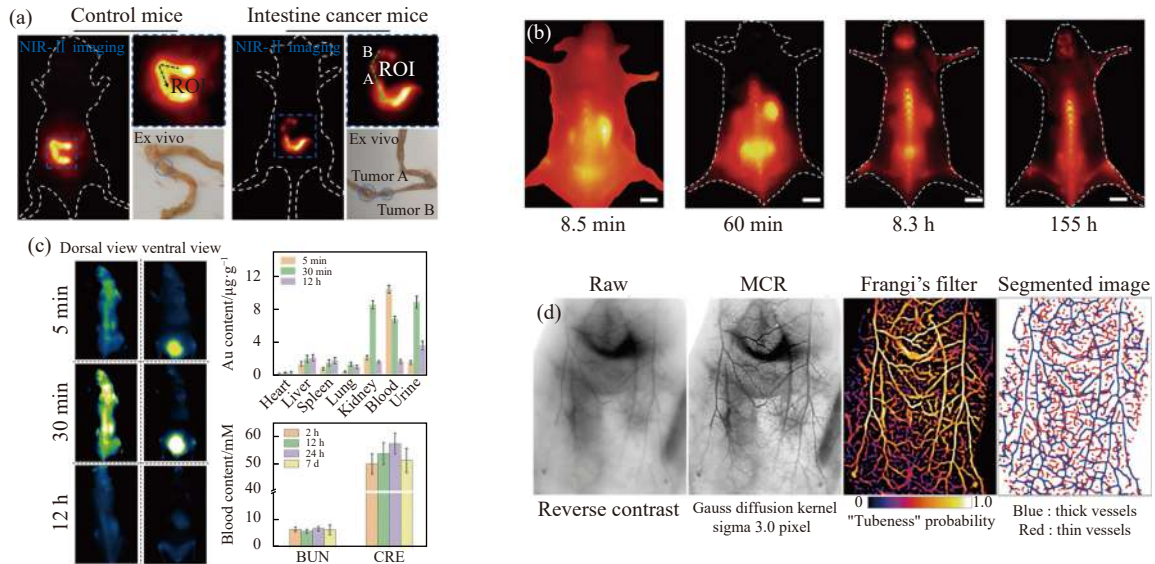


图 6 具有 NIR-II 荧光发射的 AuNCs 用于 (a) 胃肠道^[53]、(b) 骨^[54]、(c) 肾代谢^[55] 与 (d) 血管^[56] 层面的荧光成像

Fig.6 AuNCs with NIR-II emission for fluorescence imaging of (a) gastrointestinal^[53], (b) bone^[54], (c) renal metabolism^[55] and (d) blood vessel in vivo^[56]

的表面,成功实现了对肿瘤 NIR-II 荧光成像与核磁共振成像的双模态成像,进而用于指导肿瘤的放射治疗(图 7(b))^[58]。虽然具有 NIR-II 荧光发射的 AuNCs 在活体成像与应用方面已经取得了显著的成果,然而

目前对于这些 AuNCs 的体内精准靶向仍存在一定的挑战^[59-60]。如何进一步地控制 NIR-II 荧光的 AuNCs 在体内的代谢途径与稳定性,无疑将有助于未来在活体成像方面更深层次的应用。

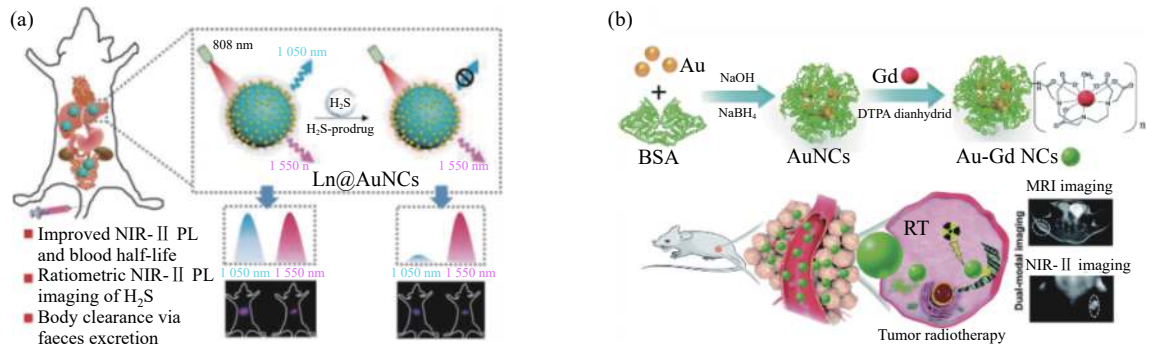


图 7 (a) NIR-II 荧光的 AuNCs 与 Ln 纳米颗粒结合实现活体内硫化氢比率荧光传感^[57]; (b) Gd 掺杂的 NIR-II 荧光 AuNCs 实现 MRI 和 NIR-II 双模态成像^[58]

Fig.7 (a) In vivo ratiometric fluorescence sensing of hydrogen sulfide by using NIR-II fluorescent AuNCs combined with Ln nanoparticles^[57]; (b) NIR-II fluorescent AuNCs doped with Gd for MRI and NIR-II dual mode imaging^[58]

4 结 论

相比其他荧光成像探针而言, AuNCs 的组成精确可调、光稳定性好与生物相容性优异等优势使得其在荧光成像领域具有较好的应用前景。研究者通过提高荧光量子产率、细胞摄取率等多种针对性的设计、制备策略,显著地推动了 AuNCs 在细胞、活体等层面

成像的应用。其中,开发了具有 NIR-II 荧光的 AuNCs,使得其在活体荧光成像的应用潜能得到进一步的提升。然而,目前 AuNCs 在荧光成像方面的应用仍然存在诸多挑战:(1)从细胞层面上如何进一步提高 AuNCs 在荧光成像方面的精度、特异性,以及拓展 AuNCs 在多种荧光成像技术尤其超分辨成像方面的潜力;(2)在活体水平上如何精准控制 AuNCs 的器

官靶向性及滞留时间,并在此基础上实现纳米探针成像、诊断、治疗的一体化;(3) AuNCs 的发光机制对于指导 AuNCs 探针的精确设计及提高其荧光成像应用性能至关重要,目前对于 AuNCs 的荧光机制尚不明晰,仍需进一步在原子水平上阐明其结构与与荧光性能的内在关联。随着这些研究工作的不断深入,荧光 AuNCs 探针在生物成像及其他相关领域的应用势必会得到进一步的推动和拓展。

参考文献:

- [1] Higaki T, Li Y W, Zhao S, et al. Atomically tailored gold nanoclusters for catalytic application [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(25): 8291-8302.
- [2] Kang X, Zhu M Z. Tailoring the photoluminescence of atomically precise nanoclusters [J]. *Chemical Society Reviews*, 2019, 48(8): 2422-2457.
- [3] Shang L, Xu J, Nienhaus G U. Recent advances in synthesizing metal nanocluster-based nanocomposites for application in sensing, imaging and catalysis [J]. *Nano Today*, 2019, 28: 100767.
- [4] Liang Y, Sun F, Shang L. Colorimetric sensing based on enzyme-mimetic activity of gold nanoclusters [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2021, 49(6): 931-940. (in Chinese)
- [5] Sun P P, Sun D, Xin X. Supramolecular self-assembly and application of metal clusters [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2021, 66(14): 1717-1732. (in Chinese)
- [6] Wang Z J, Li Q, Tan L L, et al. Metal-organic frameworks-mediated assembly of gold nanoclusters for sensing applications [J]. *Journal of Analysis and Testing*, 2022, 6(2): 163-177.
- [7] van de Looij S M, Hebls E R, Viola M, et al. Gold nanoclusters: imaging, therapy, and theranostic roles in biomedical applications [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2021, 33(1): 4-23.
- [8] Cifuentes-Rius A, Deepagan V G, Xie J, et al. Bright future of gold nanoclusters in theranostics [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(42): 49581-49588.
- [9] Shen H, Wu Q, Malola S, et al. N-heterocyclic carbene-stabilized gold nanoclusters with organometallic motifs for promoting catalysis [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(24): 10844-10853.
- [10] Wang S, Li Y, Zhu M. Progress in synthesis of thiolated metal nanoclusters with precise size [J]. *Journal of Anhui University(Natural Science Edition)*, 2017, 41(6): 1-14. (in Chinese)
- [11] Xu J, Li J, Zhong W, et al. The density of surface ligands regulates the luminescence of thiolated gold nanoclusters and their metal ion response [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2021, 32(8): 2390-2394.
- [12] Zhong W, Yan X, Qu S, et al. Site-specific fabrication of gold nanocluster-based fluorescence photoswitch enabled by the dual roles of albumin proteins [J]. *Aggregate*, 2022, 3: e245.
- [13] Shang L, Wen M. Recent progress in exploring the biological interactions of water-soluble fluorescent gold and silver nanoclusters [J]. *Journal of Anhui University (Natural Science Edition)*, 2017, 41(6): 38-45. (in Chinese)
- [14] Yu Y, Mok B Y, Loh X J, et al. Rational design of biomolecular templates for synthesizing multifunctional noble metal nanoclusters toward personalized theranostic applications [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2016, 5(15): 1844-1859.
- [15] Deepagan V G, Leiske M N, Fletcher N L, et al. Engineering fluorescent gold nanoclusters using xanthate-functionalized hydrophilic polymers: toward enhanced monodispersity and stability [J]. *Nano Letters*, 2020, 21(1): 476-484.
- [16] Dai Z, Tan Y, He K, et al. Strict DNA valence control in ultrasmall thiolate-protected near-infrared-emitting gold nanoparticles [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(33): 14023-14027.
- [17] Chen Y, Zeng C, Kauffman D R, et al. Tuning the magic size of atomically precise gold nanoclusters via isomeric methylbenzenethiols [J]. *Nano Letters*, 2015, 15(5): 3603-3609.
- [18] Xie J, Zheng Y, Ying J Y. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(3): 888-889.
- [19] Hu C, Zha R, Ling Q, et al. Super-resolution microscopy applications and development in living cell [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2017, 46(11): 1103002. (in Chinese)
- [20] Yang M, Fan J, Du J, et al. Small-molecule fluorescent probes for imaging gaseous signaling molecules: current progress and future implications [J]. *Chemical Science*, 2020, 11(20): 5127-5141.
- [21] Huang Y, Fuksman L, Zheng J. Luminescence mechanisms of ultrasmall gold nanoparticles [J]. *Dalton Transactions*, 2018, 47(18): 6267-6273.
- [22] Maity S, Bain D, Patra A. An overview on the current understanding of the photophysical properties of metal nanoclusters and their potential applications [J]. *Nanoscale*, 2019, 11(47): 22685-22723.

- [23] Wang S, Meng X, Das A, et al. A 200-fold quantum yield boost in the photoluminescence of silver-doped $\text{Ag}_x\text{Au}_{25-x}$ nanoclusters: the 13th silver atom matters [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 126(9): 2408-2412.
- [24] Yao C, Xu C Q, Park I H, et al. Giant emission enhancement of solid-state gold nanoclusters by surface engineering [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(21): 8270-8276.
- [25] Zhang X, Wu F G, Liu P, et al. Enhanced fluorescence of gold nanoclusters composed of HAuCl_4 and histidine by glutathione: glutathione detection and selective cancer cell imaging [J]. *Small*, 2014, 10(24): 5170-5177.
- [26] Deng H-H, Shi X Q, Wang F F, et al. Fabrication of water-soluble, green-emitting gold nanoclusters with a 65% photoluminescence quantum yield via host-guest recognition [J]. *Chemistry of Materials*, 2017, 29(3): 1362-1369.
- [27] Deng H, Huang K, Xiu L, et al. Bis-Schiff base linkage-triggered highly bright luminescence of gold nanoclusters in aqueous solution at the single-cluster level [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3381.
- [28] Luo Z, Yuan X, Yu Y, et al. From aggregation-induced emission of Au (I)-thiolate complexes to ultrabright Au (0)@ Au (I)-thiolate core-shell nanoclusters [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(40): 16662-16670.
- [29] Yahia-Ammar A, Sierra D, Merola F, et al. Self-assembled gold nanoclusters for bright fluorescence imaging and enhanced drug delivery [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(2): 2591-2599.
- [30] Goswami N, Lin F, Liu Y, et al. Highly luminescent thiolated gold nanoclusters impregnated in nanogel [J]. *Chemistry of Materials*, 2016, 28(11): 4009-4016.
- [31] Qu G, Jiang T, Liu T, et al. Multifunctional host polymers assist Au nanoclusters achieve high quantum yield and mitochondrial imaging [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 14(1): 2023-2028.
- [32] Huang K, Fang Q, Sun W, et al. Cucurbit [n] uril supramolecular assemblies-regulated charge transfer for luminescence switching of gold nanoclusters [J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2022, 13(1): 419-426.
- [33] Yang L, Shang L, Nienhaus G U. Mechanistic aspects of fluorescent gold nanocluster internalization by live HeLa cells [J]. *Nanoscale*, 2013, 5(4): 1537-1543.
- [34] Shang L, Yang L, Wang H, et al. In situ monitoring of the intracellular stability of nanoparticles by using fluorescence lifetime imaging [J]. *Small*, 2016, 12(7): 868-873.
- [35] Yang Y, Wang S X, Xu C Z, et al. Improved fluorescence imaging and synergistic anticancer phototherapy of hydrosoluble gold nanoclusters assisted by a novel two-level mesoporous canal structured silica nanocarrier [J]. *Chemical Communications*, 2018, 54(22): 2731-2734.
- [36] Qiao J, Mu X Y, Qi L, et al. Folic acid-functionalized fluorescent gold nanoclusters with polymers as linkers for cancer cell imaging [J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(73): 8030-8032.
- [37] Xu M M, Jia T T, Li B, et al. Tuning the properties of atomically precise gold nanoclusters for biolabeling and drug delivery [J]. *Chemical Communications*, 2020, 56(62): 8766-8769.
- [38] Pyo K, Ly N H, Yoon S Y, et al. Highly luminescent folate-functionalized Au_{22} nanoclusters for bioimaging [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6(16): 1700203.
- [39] Zhang X, Liu W, Wang H, et al. Self-assembled thermosensitive luminescent nanoparticles with peptide-Au conjugates for cellular imaging and drug delivery [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2020, 31(3): 859-864.
- [40] Zhao J Y, Cui R, Zhang Z L, et al. Cytotoxicity of nucleus-targeting fluorescent gold nanoclusters [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(21): 13126-13134.
- [41] Yang Y, Wang S X, Chen S, et al. Switching the subcellular organelle targeting of atomically precise gold nanoclusters by modifying the capping ligand [J]. *Chemical Communications*, 2018, 54(66): 9222-9225.
- [42] Cui L, Li C, Chen B, et al. Surface functionalized red fluorescent dual-metallic Au/Ag nanoclusters for endoplasmic reticulum imaging [J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187(11): 606.
- [43] Wang Y, Liang S, Mei M L, et al. Sensitive and stable thermometer based on the long fluorescence lifetime of Au nanoclusters for mitochondria [J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(45): 15072-15079.
- [44] Shang L, Stockmar F, Azadfar N, et al. Intracellular thermometry by using fluorescent gold nanoclusters [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(42): 11154-11157.
- [45] Shang L, Azadfar N, Stockmar F, et al. One-pot synthesis of near-Infrared fluorescent gold clusters for cellular fluorescence lifetime imaging [J]. *Small*, 2011, 7(18): 2614-2620.
- [46] He K, Yu S, Wang X, et al. The fabrication of transferrin-modified two-photon gold nanoclusters with near-infrared fluorescence and their application in bioimaging [J]. *Chemical Communications*, 2021, 57(80): 10391-10394.
- [47] Wei Z, Pan Y, Hou G, et al. Excellent multiphoton excitation fluorescence with large multiphoton absorption cross sections of

- arginine-modified gold nanoclusters for bioimaging [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(2): 2452-2463.
- [48] Yang H, Wu Y, Ruan H, et al. Surface-engineered gold nanoclusters for stimulated emission depletion and correlated light and electron microscopy imaging [J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(7): 3056-3064.
- [49] Yadav A, Verma N C, Rao C, et al. Bovine serum albumin-conjugated red emissive gold nanocluster as a fluorescent nanoprobe for super-resolution microscopy [J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2020, 11(14): 5741-5748.
- [50] Xu J, Shang L. Emerging applications of near-infrared fluorescent metal nanoclusters for biological imaging [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2018, 29(10): 1436-1444.
- [51] Le Guevel X, Wegner K D, Wuerth C, et al. Tailoring the SWIR emission of gold nanoclusters by surface ligand rigidification and their application in 3D bioimaging [J]. *Chemical Communications*, 2022, 58(18): 2967-2970.
- [52] Yang Y, Yu Y, Chen H, et al. Illuminating platinum transportation while maximizing therapeutic efficacy by gold nanoclusters via simultaneous near-infrared-I/II imaging and glutathione scavenging [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(10): 13536-13547.
- [53] Wang W, Kong Y, Jiang J, et al. Engineering the protein corona structure on gold nanoclusters enables red-shifted emissions in the second near-infrared window for gastrointestinal imaging [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(50): 22431-22435.
- [54] Li D, Liu Q, Qi Q, et al. Gold nanoclusters for NIR-II fluorescence imaging of bones [J]. *Small*, 2020, 16(43): 2003851.
- [55] Song X, Zhu W, Ge X, et al. A new class of NIR-II gold nanocluster-based protein biolabels for in vivo tumor-targeted imaging [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(3): 1306-1312.
- [56] Yu Z, Musnier B, Wegner K D, et al. High-resolution shortwave infrared imaging of vascular disorders using gold nanoclusters [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 4973-4981.
- [57] Li S, Ma Q, Wang C, et al. Near-infrared II gold nanocluster assemblies with improved luminescence and biofate for in vivo ratiometric imaging of H₂S [J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(5): 2641-2647.
- [58] Zhao H, Wang H, Li H, et al. Magnetic and near-infrared-II fluorescence Au-Gd nanoclusters for imaging-guided sensitization of tumor radiotherapy [J]. *Nanoscale Advances*, 2022, 4(7): 1815-1826.
- [59] Tang H, Li Q, Yan W, et al. Reversing the chirality of surface ligands can improve the biosafety and pharmacokinetics of cationic gold nanoclusters [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(25): 13829-13834.
- [60] Qu S, Jia Q, Li Z, et al. Chiral NIR-II fluorescent Ag₂S quantum dots with stereospecific biological interactions and tumor accumulation behaviors [J]. *Science Bulletin*, 2022, 67(12): 1274-1283.